

201221038A

厚生労働科学研究費補助金

がん臨床研究事業

抗がん剤効果予測による乳がん患者の再発リスク抑制と
毒性軽減および医療経済負担低減に関する検証的研究

平成24年度 **総括・分担研究報告書**

研究代表者 戸井 雅和

平成25(2013)年 5月31日

厚生労働科学研究費補助金

がん臨床研究事業

抗がん剤効果予測による乳がん患者の再発リスク抑制と
毒性軽減および医療経済負担低減に関する検証的研究

平成24年度 研究報告書

研究代表者

戸井 雅和

京都大学大学院医学研究科外科学講座乳腺外科学 教授

研究分担者

笹野 公伸

東北大学大学院医学系研究科 医科学専攻病理病態学講座・病理診断学 教授

山城 大泰

京都大学大学院医学研究科外科学講座乳腺外科学 非常勤講師

石黒 洋

京都大学医学部附属病院 探索医療センター検証部・外来科学療法部 改革推進講師

稲本 俊

天理医療大学 医療学部 学部長

内藤 泰宏

慶応義塾大学 環境情報学部 准教授

杉本 昌弘

京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター

悪性制御研究プロジェクト 特定講師

近藤 正英

筑波大学医学医療系 保健医療学域 保健医療政策学・医療経済学 准教授

黒井 克昌

東京都立駒込病院 外科(乳腺)・臨床試験科 部長

平成25(2013)年 5月31日

目 次

I. 総括研究報告	
抗がん剤効果予測による乳がん患者の再発リスク抑制と 毒性軽減および医療経済負担軽減に関する検証的研究 戸井雅和	----- 1
II. 分担研究報告	
1. 乳癌における新規バイオマーカーLIN28B の意義に関する研究 笹野 公伸	----- 6
2. 乳癌の術前化学療法の効果予測モデルの前向き試験とモデル化手法の汎用化の検 討 内藤 泰宏 杉本 昌弘 高田 正泰	----- 14
3. 薬物療法の効果予測における TOP02 の意義の検討 山城 大泰	----- 24
4. 乳癌原病巣と再発巣におけるバイオマーカーの比較検討 CD44 の意義に関する研究 黒井 克昌 宮本 博美	----- 33
5. 抗がん剤効果予測と毒性軽減に必要な患者情報のデータベース化のための問診シ ステムの開発 稲本 俊	----- 35
6. がん薬物療法の副作用軽減と医療経済学的効果 石黒 洋	----- 42
7. 21 遺伝子シグネチャに関する英国 NICE 勧告案の本邦での検討 近藤 正英	----- 44
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 47
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 巻末

抗がん剤効果予測による乳がん患者の再発リスク抑制と毒性軽減および
医療経済負担軽減に関する検証的研究
総括研究報告書

研究代表者 戸井 雅和 (京都大学大学院医学研究科外科学講座乳腺外科)

研究要旨

術前後の化学療法は原発性乳がん患者の再発リスクを抑制し予後を有意に改善するが、その一方、毒性によるQOLの低下、医療経済的負担、治療対象群における治療効果の不均一性などの課題も存在する。いずれも乳がん診療上の重要な課題であり、その克服は乳がん診療の向上、予後とQOLの改善、個別化の推進、医療経済効率の改善に直結する。このような点から臨床研究を企画、実施展開、成果と問題点をまとめる。

治療効果の予測精度を高め、新しい治療法の導入を図ることは予後の向上につながり、治療効果の低い治療法からの回避、毒性の防止はQOLの向上に寄与する。本年度は、予測精度改善を目的とし、治療効果、特に術前化学療法、や乳がんの病態を予測する数理モデルの構築と改良、Webシステムの開発、現在実地臨床で用いられている効果予測バイオマーカー検査法の最適化、新しい治療効果予測マーカーの探索、転移巣の探索を行った。また、臨床情報の抗がん剤効果予測および毒性軽減において、抗がん剤を受ける患者の医療情報は重要であり、問診により聴取する情報を充分かつ的確に収集するため、タッチパネル方式で入力のできる問診システムの開発を行った。毒性の軽減に関しては、支持療法に関する最適化と予後因子と治療効果予測因子を組み合わせた治療の個別化を中心に検討を行った。医療経済学的検討では、原発性乳がん術後化学療法の適応に関し、費用対効果も含めたガイドライン作りで主導的な立場にある英国のNational Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) から既存のコンセンサスガイドラインで再発リスクが中等度の症例に限り、21遺伝子シグネチャ検査の使用を薦める勧告案が検討されたことをうけ、わが国の保険診療へのNICE勧告に準じた形での導入に関して費用対効果を検討した。

これらの検討から、治療効果予測数理モデルに関しては術前化学療法の高精度効果予測システムを完成し、webシステムを構築して多施設で前向きに性能の評価を行った。また、課題としてtriple negative typeの乳がんにおける予測が難しいことが明らかになったので、同対象に関しては新しい分子マーカーの導入を図るべく検討を開始した。既存のマーカーについては、これまで3年間検討を行ってきた病理組織学的グレード、増殖指標Ki67 labeling index (LI), estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR), HER2, topoisomerase (TOPO)-II, 21遺伝子シグナチャー等を組み合わせた診断基盤の最適化を行い、予後予測と治療効果予測を組み合わせた多剤併用化学療法とホルモン療法の個別化(化学療法の回避)システムの構築を行った。さらに、原発巣と転移巣のphenotypeの違い、また治療前後における変化が認められる症例が存在することが最近の研究から見出され、ER, PgR, HER2の相違、変化の実態を明らかにした。新しい効果予測因子については、RNA結合タンパクであるLIN28、let-7を中心に検討を進めた。Let-7はがん細胞の増殖抑制に働くことが知られているが、その発現制御するLIN28自体の発現意義については明らかではなかった。今回の研究からは、LIN28Bが細胞質に検出される症例ではKi-67 LIが有意に高いという結果が得られ、さらに乳がん培養細胞株を用いた解析では、LIN28BのsiRNAによるノックダウンによって増殖の抑制効果が得られた。LIN28Bは細胞質で機能を発揮し、細胞増殖に働くと考えられ、これらの因子の探索が効果予測因子になりうる可能性が示唆された。タッチパネル方式で入力できる問診システムには33項目を選択し、これらの情報が抗がん剤効果予測や毒性軽減のための方策を解析する時に利用できるようにデータベース化、かつほとんど全ての項目をタッチパネル方式で選択できるように開発調整した。この問診システムは得られる情報量の多さに比較して患者の負担が少なく、情報は患者自身が入力するため、より正確な情報が得られると考えられた。毒性軽減支持療法について

てはantipsychotics, G-CSF製剤に関する検討を行い、その有用性や使用法の改良に関する知見をえたので、結果を報告した。医療経済学的検討からは、NICE推奨に準じた21遺伝子シグナチャ導入は、リンパ節転移陰性例を対象とした場合、リンパ節転移+/−例を対象とした場合、増分費用効果比はそれぞれ、¥305,414/QALYと¥600,863/QALYであった。これらは医療の技術革新に対する社会的支払い意思額の閾値¥5,000,000/QALYを下回り、21遺伝子シグネチャの使用は費用対効果に優れており、経済性の観点から、わが国でもNICEに準じた形での導入を支持することができると考えられた。

一連の検討からいくつかの新しい課題も明らかになったが、全体としては原発性乳がん

診療における複雑な意思決定の過程の可視化、新規効果予測webモデル開発が行われ、予後予測、効果予測基盤の整備と最適化が著しく進み、新しい治療効果予測因子の研究、ならびに新たなタッチパネル方式問診入力システムの開発に大きな進展があり、他方、毒性軽減に関しては新しい支持療法の検討、また化学療法を回避できる亜群の選別に関する治療個別化システムを実地臨床レベルで検討するなど、いくつかの新手法の開発、基盤整備と最適化が行われ、非常に大きな成果が得られたと考えられる。さらに、医療経済性の検討では、NICE推奨手法のわが国に導入した場合の費用対効果の検討を行い有用な成果をえた。抗がん剤効果予測による乳がんの再発リスク抑制と生存成績の向上、毒性軽減および医療経済負担軽減は同時に実現可能になりつつあると考えられた。

A. 研究目的

術前後の化学療法適応決定、治療の個別化は現在の乳がん治療における最も重要な課題のひとつである。本研究では、抗がん剤の効果予測によって乳がん患者の再発リスクを抑制すると同時に毒性軽減を図り、加えて医療経済的負担軽減を推進することを主たる目的とする。さらに各グループごとに細分化された研究目的を設定し、研究を進めた。

数理モデル研究では、ADTreeモデルを用い、術前化学療法の病理組織学的抗腫瘍効果を予測するシステムの改良と前向き性能評価を行うことを目的とした。本研究で構築された数理モデルと従来から使われている多重ロジスティック回帰(Multiple logistic regression; MLR)を比較し予測精度だけでなく、データ欠損に対する耐性の比較や、今後別の診療に重要な因子を予測する場合にどのような方針でモデルのパラメータを最適化すればよいか、方法論を汎用化するための検証・評価を行うことも目的とした。本数理モデルを用いたWeb支援システムの開発、改良を行うことも目的の一つである。

現在実地臨床で用いられている効果予測性を有するバイオマーカーについて、検査法の最適化、複数の検査法を組み合わせてよりの確に抗悪性治療薬の効果、及び予後を予測、治療の個別化と治療成績の改善を図ることを目的とした。また、腫瘍の進展、あるいは治療に伴うマーカー発現の変化を検討することも目的の一つとした。

臨床情報の集積にあたり、抗がん剤を受ける患者の医療情報は重要であり、問診により聴取する情報を充分かつ的確に収集することを目的として、タッチパネル方式で入力のできる問診システムの開発を行うこととした。

予後因子と治療効果予測因子を組み合わせる必要な治療を必要な患者に届ける治療の個別化を目的として、術前ホルモン療法の臨床効果、病理組織学的効果、分子マーカーに関する検討素を行った。ホルモン療法とメトロニック型化学療法を用いた術前治療の検討も行った。また、支持療法の最適化による毒性軽減を図ることも目的とした。

医療経済学的検討では、原発性乳がんにおける化学療法の適応に関し、英国のNational Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) の推奨のわが国の保険診療体制での導入に関する費用対効果を検討することも研究目的とした。

B. 研究方法

治療効果予測数理モデルに関しては、アンストラサイクリン、タキサン併用術前化学療法臨床試験OOTR003症例を主対象に情報を収集しモデルを作成し、予測アウトカムは術前化学療法終了時における腋窩リンパ節転移を伴わない乳房内の浸潤がんの消失(y_pT0/isN0)とした。モデルの精度は学習用データで受信者動作特性(ROC)曲線以下の面積AUC (Area under ROC)を用い評価した。予測精度は、Luminalタイプ、HER2過剰発現タイプ、トリプルネガティブ(TN)タイプの3つのサブタイプ別に検証した。

予測精度を向上させるため、ADTreeを複数作成し最終的な予測は、個々のADTreeの予測結果を平均化して算出するensembleの手法を用いた。クロスバリデーションを用いてパラメータの最適化を行った。また、重要な欠損値に対する耐性を調べた。

既存のバイオマーカー検査法の最適化、基盤の整備構築については、病理組織学的所見、増殖指標Ki67 labeling index (LI), estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR), HER2, topoisomerase (TOPO)-II, 21遺伝子シグナチャなどを組み合わせた診断基盤の最適化を行った。予後予測と治療効果予測を組み合わせた多剤併用化学療法とホルモン療法の個別化(化学療法の回避)システムの構築を行うこととした。さらに、原発巣と転移巣のマーカー発現の違いと治療前後の変化を検討した。

新しい効果予測因子については、RNA結合タンパクLIN28、let-7などの検討を行い、乳がん細胞の増殖に関する役割機能分析を行うこととした。LIN28BのsiRNAによるノックダウンなどの手法を用いた。

タッチパネル方式で入力できる問診システムの作ではiPadを用いた。入力する項目を選択決定し、情報をデータベースできるように調整することとした。

化学療法の個別化に関連して、術前ホルモン療法の感受性評価、効果予測因子、さらに治療中の治療効果の評価方法を検討した。支持療法については、antipsychotics, G-CSF製剤に関する検討を行うこととした。

医療経済学的検討では、NICE推奨に準じた21遺伝子シグナチャの本邦保険制度下の経済効率性評価をリンパ節転移陰性例、リンパ節転移+/−例を対象に行った。

C. 結果と考察

一連の検討からいくつかの成果がえられ、同時に課題も明らかになった。それらを項目ごとにまとめた。

数理モデル研究においては、腫瘍のサブタイプ別に病理組織学的抗腫瘍効果の予測精度が異なることが明らかになった。Luminalタイプでは汎用性も確保できるほど高い精度で予測できたが、HER2高発現タイプとTNタイプでは精度が劣化し、特にTNタイプでは予測精度は低いレベルにとどまり、新たな取り組みの必要性が示唆された。次に、ADTreeを使ったモデルとMLRの欠損値への耐性を比較するために、欠損値に乱数を入れた計算したが、学習データでも評価データでもADTreeの結果はMLRの結果より有意に高い値を示し、ADTreeがMLRに比べ欠損値への耐性があることが示唆された。

本数理モデルは汎用性を備え、臨床的検討を行っているが、今後は腫瘍サブタイプ別のモデルを開発する必要がある。また、治療法別に、特にER陽性乳がんに対するホルモン療法の効果予測、HER2陽性乳がんに対する抗HER2療法を含む治療法の効果予測など、のモデル開発が望まれる。その際に、新たなバイオマーカーを導入する必要性が強く示唆された。さらに、新しい画像診断とも組み合わせる必要があると思われる。

既存のバイオマーカー検査法の最適化に関して、多数例でER、PgR、HER2、Ki67 LI、TOPOIIaに関して、バーチャルマイクロコピーと免疫染色自動解析装置の妥当性の検討を行い、従来の目視判定スコアと高い正相関を示していることを確認した。TOPOIIaとKi-67 LIやGrade、HER2は正の相関性を示した。術前化学療法施行例の検討ではER、HER2の発現に加え、CK5/6やEGFRなどのBasalマーカーの発現状況が化学療法の予測精度を向上させる可能性があるか検討した。Basal マーカーはER低発現、HER2陰性のグループやER強発現、HER2陽性のグループで、

おおむね半数ずつ発現しており、今後さらに治療反応性の違いを検証する必要性が示唆された。

原発巣と再発巣のバイオマーカー発現状況の検討は83例を対象に ER, PgR, HER2について行い、ERの不一致率は21.7%, PgRの不一致率は30.0%, HER2の不一致率は 6.3%の結果を得た。サブタイプの変化は、23.8%の症例で認められた。原発巣、再発巣間のバイオマーカー不一致の有無による再発後生存率の差は認められなかった。

腫瘍内のバイオマーカー発現に関する不均一性、腫瘍進展に伴う変化、クローン選択、また治療に伴う変化に関する研究の重要性は広く認識指摘される所であり、今後さらに検討を深める必要がある。

新しい効果予測因子研究では、RNA結合タンパクであるLINs28、let-7を中心に検討を進めた。Let-7はがん細胞の増殖抑制に働くことが知られているが、その発現制御するLIN28自体の発現意義については明らかではなかった。今回の研究からは、LIN28Bが細胞質に検出される症例ではKi-67 LIが有意に高いという結果が得られ、さらに乳がん培養細胞株を用いた解析では、LIN28BのsiRNAによるノックダウンによって増殖の抑制効果が得られた。LIN28Bは細胞質で機能を発揮し、細胞増殖に働くと考えられ、これらの因子の探索が効果予測因子になりうる可能性が示唆された。

タッチパネル方式で入力できる問診システムの開発では、iPadを用い、キーボードを用いずにタッチパネル方式でほとんどの項目を選択し、入力する方法を用いた。抗がん剤効果予測や毒性軽減を視野にいれながら因子の抽出選択を考慮した。開発した問診システムの基本的なコンセプトは、患者が容易に入力でき、入力はすべて数字またはカテゴリー化されて行われ、電子化医療情報のセキュリティが守られ、修正や確認が容易にできるものとした。本問診システムは情報量の多さに比較して患者の負担が少なく、情報は患者自身が入力するため、正確な情報が得られ、実地臨床において有用であると考えられた。

毒性軽減支持療法についてはantipsychotics, G-CSF製剤等に関する検討を行ったが、毒性の軽減に有用な臨床データをえることができ、また臨床的検討をすることができた。それらの結果は学術誌に発表した。術前ホルモン療法、特にメトロミック型治療法の検討からは、治療に伴う細胞増殖能の変化、バイオマーカー発現の変化を検討し、更に初期治療の選択を化学療法、ホルモン療法それぞれを選択した際の治療経過等に関するシミュレーションを行い、初期治療選択における意思決定の意義を検討した。将来的に、数理モデル解析、医療経済的検討とあわせることで、より本研究テーマに適合した治療アルゴリズムの構築が可能になると思われた。

医療経済学的検討においては、英国NICEの推奨に準じた多遺伝子アッセイ21遺伝子シグナチャの導入を本邦の保険診療体制下で行った場合の効率性を、リンパ節転移陰性、リンパ節転移+/-例で検討した。増分費用効果比はリンパ節転移陰性¥305,414/QALY、リンパ節転移+/-例で¥600,863/QALYであった。これらは医療の技術革新に対する社会的支払い意思額の閾値¥5,000,000/QALYを下回り、21遺伝子シグネチャの使用は費用対効果に優れており、経済性の観点から、わが国でもNICEに準じた形での導入を支持することができると考えられた。

D. 結論

1) 術前化学療法の反応性を予測するモデルを開発した。前向き試験を実施し、Luminalタイプ乳がんでは治療効果を高精度に予測することを示した。ただし、HER2高発現タイプやTNタイプは、現状のモデルでは高い精度を示すことができず、症例数を増やすとともに、新たなバイオマーカーの導入、サブタイプごとに特化したモデルの開発の必要性が示唆された。一般にノモグラムで利用されるMLRより、多くの因子を考慮することができ、予測精度や欠損値への耐性も高いことが証明された。

2) 原発巣と再発巣の間のサブタイプの変化は、23.8%の症例で認められた。ホルモン受容体の変化率に対し、HER2における不一致の頻度は少なかった。

3) 乳がん組織において、LIN28Bは細胞質において機能を発揮、がん細胞増殖に働くことが示唆された。HER2な

どの既知の増殖因子とのクロストークやMusashi1との共役に関してなど、更なる検討が必要である。

4) 新たに問診入力システムの開発を行った。本問診システムを用いることで患者の医療情報の量や質が大幅に改善できると考えられた。そこで得られるデータは抗がん剤効果予測や毒性減弱の解析に資すると考える。

5) 化学療法を必要としない患者群の同定における術前ホルモン療法、メトロニック型の治療の役割について検討した。また、毒性軽減指示料に関する検討を行った。

6) 多遺伝子アッセイ21遺伝子シグネチャ検査について、再発リスク中等度の症例への使用がNICEによって勧告されると、本邦保険診療への同様の形での導入の議論が始まると考えられるが、本研究結果からは、そのような形での導入を支持することができる。

乳癌における新規バイオマーカーLIN28Bの意義に関する研究

研究分担者 笹野 公伸 東北大学大学院医学系研究科教授

研究要旨：

RNA 結合タンパクである LIN28 は let-7 の発現を抑制することが知られているが、実際の癌組織での検討は行われていない。我々は以前、乳癌組織において RNA 結合タンパクである LIN28 と let-7 の発現が逆相関を示すことを報告した。Let-7 は癌細胞の増殖抑制に働くことが知られているが、その発現を制御する LIN28 自体の発現意義については明らかではない。本研究では LIN28B の乳癌での発現意義を検討することを目的とした。LIN28B は細胞質と核に存在することが知られているが、その意義については未だ明らかにされていない。浸潤性乳管癌（n=90）での免疫組織化学での検討は、LIN28B が細胞質に検出される症例では Ki-67 labeling index が有意に高いという結果が得られた。さらに乳癌培養細胞株（MCF-7, SK-BR-3）を用いた in vitro 解析では、LIN28B の siRNA によるノックダウンによって増殖の抑制効果が得られた。以上の結果から、LIN28B は細胞質においてその機能を発揮し、癌細胞増殖に働いていることが示唆された。この機能について、既知の増殖因子とのクロストーク等の更なる検討が必要である。

A. 研究目的

Let-7はRASやHMGA2などの癌遺伝子を抑制することが明らかにされており、その発現が肺癌や肝細胞癌を始めとして様々な癌で極端に減少していることが報告されている。一方、近年トムソンらによってiPS細胞に導入された遺伝子の一つとして知られているLIN28は (Yu J, et al, Science 2007)、RNA結合蛋白質としてLet-7の成熟を特異的に阻害し、細胞増殖の促進に関与していることが肺癌や卵巣癌などにおいて報告されている (Iliopoulos D, et al, Cell 2009; Lu L, et al, Eur. J. Cancer 2009; Oh JS, et al, Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2010; Hamano R, et al, Br J Cancer. 2012)。LIN28についてはiPS誘導転写因子の観点から癌幹細胞との関係が示唆されるが、乳癌組織における発現意義については十分に検討されていない。

以前に我々はヒト乳癌におけるLIN28およびそのホモログであるLIN28BとLet-7との関係について検討した。この検討では、乳癌組織においてLIN28の発現（免疫組織化学）がとlet-7の発現（定量的PCR）が逆相関することを明らかにした (Sakurai M, et al, J Steroid Biochem Mol Biol. 2012)。この研究ではさらにLIN28/LIN28Bの発現が増殖マーカーであるKi-67の発現と正相関することも明らかにした。このことからLIN28sによる直接的な癌細胞増殖機構の存在が示唆される。

LIN28Bは細胞質と核に存在することが知られており、それぞれ特異的な機能を発揮すると考えられているが (Piskounova E, et al, Cell 2011)、その意義については未だ明らかにされていない。本研究ではLIN28ホモログであるLIN28Bの乳癌組織での発現局在と、その意義

について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

症例：東北大学病院の乳癌症例（ホルマリン固定パラフィン包埋組織；浸潤性乳管癌；90症例）を用いた。

免疫組織化学：LIN28B抗体は市販のRabbit polyclonal antibody (Abcam Ltd., Cambridge, UK)を用い、染色キットとしてHistofine kit (Nichirei Co Ltd.,東京)を使用した。エストロゲン受容体の染色は自動染色装置BENCH MARK (Ventana Medical Systems, AZ, USA)を用いた。Ki-67の染色にはMouse monoclonal antibody (MIB-1; DakoCytomation Co. Ltd., Kyoto, Japan)を使用した。

免疫染色化学法の評価：LIN28Bの発現については、核陽性、細胞質陽性、核および細胞質陽性、陰性の4群に評価した。エストロゲン受容体およびKi 67の評価については、癌細胞1,000個中の細胞における陽性細胞の割合を算出し (Labeling Index : LI) 、さらに10 %以上を陽性とした。LIN28Bとエストロゲン受容体、Ki-67の発現との関連、種々の臨床病理学的因子との関連を統計学的に解析した。

培養細胞：乳癌培養細胞株MCF-7、SK-BR-3（以上、東北大学加齢医学研究所 医用細胞資源センター、仙台）、MDA-MB-231、T-47D（以上、ATCC、USA）を使用した。

免疫細胞化学：血清非添加の条件下で細胞を24時間培養し、その後、血清を含む培地で培養を行い、さらに24時間後にLIN28Bの発現・細胞内局在を評価した。細胞はスライドガラスに直接培養し、免疫組織化学に使用した。抗体および染色キットは免疫組織化学に準じる。

細胞増殖試験：細胞増殖の評価にはCell

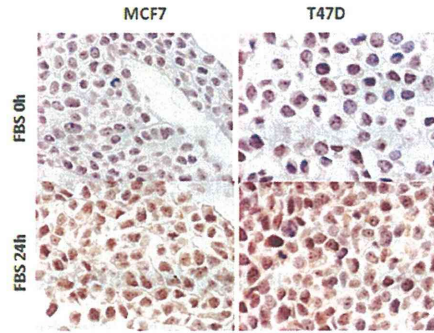
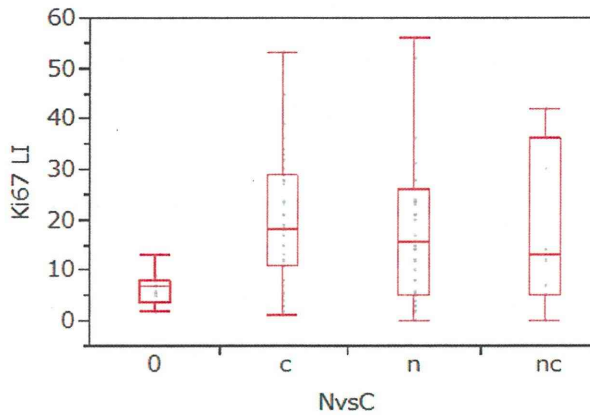
counting kit（同仁化学、熊本）を使用した。LIN28およびLIN28Bの発現をsiRNAにてノックダウンし、細胞増殖におよぼす影響を確認した。

統計解析：解析にはStat View 5.0 J Software (SAS Institute, NC, USA) を用い、 χ^2 検定、Bonferroni / DunnおよびMann - Whitney U testを行った。P<0.05を有意差ありと判断した。（倫理面への配慮）

本研究の計画書については東北公東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会（No. 2010-572）の承認を得ている。

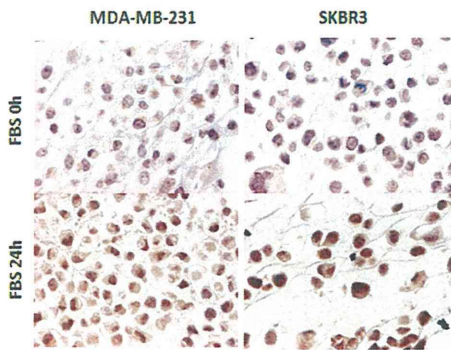
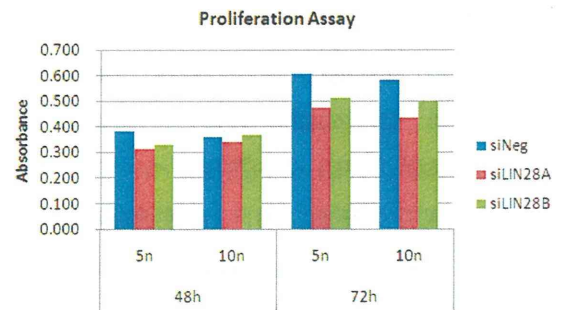
C. 研究結果

免疫組織化学：4群に評価したLIN28Bの発現分布は以下のとおりである：核陽性n=30、細胞質陽性n=47、核および細胞質陽性n=10、陰性n=13。臨床病理学的因子との関係では、LIN28B細胞質陽性群で組織学的悪性度 (Histological grade) が有意に高く (P=0.036)、エストロゲン受容体の発現が有意に低かった (p=0.048)。Ki-67の発現とLIN28Bの発現パターンとの関連では (図1)、LIN28B核陽性：17.2%、細胞質陽性：19.9%、核および細胞質陽性：18.7%、陰性6.46% (%はKi-67 LIの中央値を示す) という結果を示し、LIN28Bが発現しない症例では有意にKi-67の発現が低かった (p=0.009)。



培養細胞：血清添加後のLIN28Bの細胞内局在を図2に示す。血清添加前のLIN28Bの発現について、実験に使用した4つの乳癌培養細胞株いずれにおいて細胞質・核ともにその発現は低かった。一方、血清を添加することによって、いずれの細胞株ともに細胞質・核のLIN28の免疫反応は著しく増加していた。

細胞増殖試験：LIN28s siRNAによる細胞増殖の変化の結果を図3に示す。通常培養を行ったT-47DにLIN28AおよびLIN28BのsiRNAを導入した結果、いずれにおいても導入72時間後に有意な細胞数の低下を確認した。



D. 考察

細胞質でのLIN28Bの発現とKi 67が正相関していることはこれまでの卵巣癌や食道癌での報告と一致しており、LIN28Bが癌細胞の増殖に関与していることが考えられる。LIN28は細胞周期によって細胞内局在が異なることが知られている(Balzer E & Moss EG, RNA Biol. 2007)。最近の報告では、LIN28Aは細胞質においてZcchc11に結合することで活性化

しLet-7を抑制する一方、LIN28Bは核内においてZcchc11非依存的にLet-7の前駆体の成熟阻害することが可能であることが明らかにされた (Hagan JP, et al, Nat Struct Mol Biol, 2009)。本研究での乳癌培養細胞を用いた研究では、血清非添加によって細胞増殖停止に同調（0期同調）した細胞は、血清の添加で細胞増殖を開始すると考えられる。細胞増殖の開始によってLIN28Bの発現は顕著に増加したことから、LIN28Bの発現が細胞増殖に関与することが示唆される。しかし本研究結果では、LIN28Bの発現局在について明らかな変化は認められず、細胞質に局在するLIN28Bが癌増殖に関与するという免疫組織化学の結果を裏付けることが出来なかった。今後、標識したLIN28Bの遺伝子導入などを用い、より詳細な細胞内局在を評価することが必要であると考えられた。また、認識部位の異なる抗体を使用し、LIN28Bの局在を再検討することも必要である。

免疫組織化学での検討では、細胞増殖能との関連に加え、Histological gradeとの相関も同様に確認できた。早期Luminal型乳癌では、Histological gradeとki-67の相関が報告されており、再発予測有用であると考えられている (Naito Y, et al, ASCO 2012 proceeding)。したがって、乳癌においてLIN28の発現は、癌の悪性度を評価するsurrogate markerとして有用かもしれない。しかし一方、エストロゲン受容体との関連では、LIN28Bの発現はエストロゲン受容体と負の相関を示した。このことから、エストロゲン受容体陰性癌においても、LIN28Bは癌悪性度の指標となるかもしれない。LIN28Bとエストロゲン受容体との関係から、エストロゲンによるLIN28Bの発現調節の可能性が考えられるが、我々の検討ではエストロ

ゲンの添加によってLIN28B mRNAの発現変化は確認できなかった (data not shown)。したがって、エストロゲンによるLIN28Bの発現調節の可能性は低く、両因子に直接的な関係は無いことが考えられる。

Lin28が細胞質から核に移行する現象が確認されているが、この核移行にMusashi1が関与することが明らかとなった。Musashi1はLIN28Bの核移行を促進することで、miR-98の生成過程を阻害することが報告された (Kawahara H, et al, J Biol Chem. 2011)。Musashi1は細胞質に優位に局在するが、Musashi1の核-細胞質間のshuttlingによって、Lin28の機能に大きく関わっていることが考えられている (Kawahara H, et al, J Biol Chem. 2011)。以上のことからLIN28Bの機能を病理組織学的に評価する上で、今後Musashi1を含めて包括的な発現解析を行うことが重要であると考えられる。

E. 結論

乳癌組織において、LIN28Bは細胞質においてその機能を発揮し、癌細胞増殖に働いていることが示唆された。乳癌培養細胞においても同様に、増殖過程にLIN28Bが関与することを明らかにした。今後、HER2などの既知の増殖因子とのクロストークやMusashi1との共役に関してなど、更なる検討が必要であると考えられる。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ebata A, Suzuki T, Takagi K, Miki Y, Onodera Y, Nakamura Y, Fujishima F, Ishida K, Watanabe M, Tamaki K, Ishida T, Ohuchi N, **Sasano H**. Oestrogen-induced genes in ductal carcinoma in situ: their comparison with invasive ductal carcinoma. *Endocr Relat Cancer*. 2012 Jul 18;19(4):485-96.
2. Shibahara Y, Miki Y, Onodera Y, Hata S, Chan MS, Yiu CC, Loo TY, Nakamura Y, Akahira J, Ishida T, Abe K, Hirakawa H, Chow LW, Suzuki T, Ouchi N, **Sasano H**. Aromatase inhibitor treatment of breast cancer cells increases the expression of let-7f, a microRNA targeting CYP19A1. *J Pathol*. 2012 Jul;227(3):357-66.
3. Chan MS, Wang L, Chanplakorn N, Tamaki K, Ueno T, Toi M, Loo WT, Chow LW, Suzuki T, **Sasano H**. Effects of estrogen depletion on angiogenesis in estrogen-receptor-positive breast carcinoma--an immunohistochemical study of vasohibin-1 and CD31 with correlation to pathobiological response of the patients in neoadjuvant aromatase inhibitor therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2012 Mar;16 Suppl 1:S69-78. E
4. Sakurai M, Miki Y, Masuda M, Hata S, Shibahara Y, Hirakawa H, Suzuki T, **Sasano H**. LIN28: a regulator of tumor-suppressing activity of let-7 microRNA in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2012 Sep;131(3-5):101-6.
5. Samarajeewa NU, Yang F, Docanto MM, Sakurai M, McNamara KM, **Sasano H**, Fox SB, Simpson ER, Brown KA. HIF-1alpha stimulates aromatase expression driven by prostaglandin E2 in breast adipose stroma. *Breast Cancer Res*. 2013 Apr 8;15(2):R30.
6. McNamara KM, Yoda T, Miki Y, Chanplakorn N, Wongwaisayawan S, Incharoen P, Kongdan Y, Wang L, Takagi K, Mayu T, Nakamura Y, Suzuki T, Nemoto N, Miyashita M, Tamaki K, Ishida T, Ohuchi N, **Sasano H**. Androgenic pathway in triple negative invasive ductal tumors: Its correlation with tumor cell proliferation. *Cancer Sci*. 2013 May;104(5):639-46.
7. Shibahara Y, Miki Y, Ishida T, Nakamura Y, Suzuki T, Ohuchi N, **Sasano H**. Immunohistochemical analysis of aromatase in metastatic lymph nodes of breast cancer. *Pathol Int*. 2013 Jan;63(1):20-8.
8. Takagi K, Miki Y, Shibahara Y, Nakamura Y, Ebata A, Watanabe M, Ishida T, **Sasano H**, Suzuki T. BUB1 immunolocalization in breast carcinoma: its nuclear localization as a potent prognostic factor of the patients. *Horm Cancer*. 2013 Apr;4(2):92-102.
9. Chan MS, Wang L, Felizola SJ, Ueno T, Toi M, Loo W, Chow LW, Suzuki T, **Sasano H**. Changes of tumor infiltrating lymphocyte subtypes before and after neoadjuvant endocrine therapy in estrogen receptor-positive breast cancer patients—an immunohistochemical study of Cd8+ and Foxp3+ using double immunostaining with correlation to the pathobiological response of the patients. *Int J Biol Markers*. 2012 Dec 27;27(4):e295-304.
10. Tamaki K, Tamaki N, Kamada Y, Uehara K,

- Ohuchi N, Miyashita M, Ishida T, Sasano H. Clinical significance following breast conservation therapy with or without irradiation in breast cancer patients. *Jpn J Clin Oncol*. 2013 Mar;43(3):251-7.
11. Takagi K, Moriya T, Kurosumi M, Oka K, Miki Y, Ebata A, Toshima T, Tsunekawa S, Takei H, Hirakawa H, Ishida T, Hayashi S, Kurebayashi J, Sasano H, Suzuki T. Intratumoral estrogen concentration and expression of estrogen-induced genes in male breast carcinoma: comparison with female breast carcinoma. *Horm Cancer*. 2013 Feb;4(1):1-11.
2. 学会発表
1. 柴原裕紀子、三木康宏、端 秀子、小野寺好明、中村保宏、赤平純一、阿部佳子、笹野公伸：乳癌におけるアロマターゼ阻害剤投与によるmicroRNA の変動およびLet-7f によるCYP19A1の制御に関する検討：第101回日本病理学会総会 2012年 東京都
2. 齊藤涼子、三木康宏、大庭悠貴、端 秀子、中村保宏、鈴木 貴、笹野公伸：乳癌組織におけるAryl hydrocarbon receptor と臨床学的事項およびaromatase 発現との関わりについての検討：第101回日本病理学会総会 2012年 東京都
3. 岩渕英里奈、三木康宏、小野寺好明、小野克彦、笹野公伸：近接ライゲーションアッセイ法を用いたestrogen receptor ダイマーの可視化の検討：第101回日本病理学会総会 2012年 東京都
4. Keely May McNAMARA, Yasuhiro MIKI, Niramol CHANPLAKOM, Sansanee WONGWAISAYAWAN, Pimpin INCHAROEN, Yasuhiro NAKAMURA, Takashi SUZUKI, Minoru MIYASHITA, Kentaro TAMAKI, Takonori ISHIDA, Noriaki OHUCHI, Hironobu SASANO : Co-Expression of Androgen Receptor and $5\alpha R1$ in Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) Is Associated with Lower Rates of Tumor Cell Proliferation : The 94th Annual Meeting of The Endocrine Society 2012 Houston (USA)
5. Kevin C KNOWER, Ashwini CHAND, Natalie ERIKSSON, Kiyoshi TAKAGI, Yasuhiro MIKI, Hironobu SASANO, Geoff LINDEMANN, Jane VISVADER, George MUSCAT, Evan R SIMPSON, Colin D CLYNE : Profiling of Nuclear Receptor Expression in Breast Cancer-Associated Fibroblasts Identifies RORA, THRB, VDR and PPARG as Potential Mediators within the Tumor Microenvironment : The 94th Annual Meeting of The Endocrine Society 2012 Houston (USA)
6. Yukiko SHIBAHARA, Yasuhiro MIKI, Shuko HATA, Yoshiaki ONODERA, Noriaki OHUCHI, Hironobu SASANO : Aromatase inhibitor treatment of breast cancer cells increases the expression of let-7f, a microRNA targeting CYP19A1 : 第71回日本癌学会学術総会 2012年 札幌市
7. Keely May McNAMARA, Yasuhiro MIKI, Niramol CHANPLAKOM, Sansanee WONGWAISAYAWAN, Pimpin

- INCHAROEN, Yasuhiro NAKAMURA, Takashi SUZUKI, Minoru MIYASHITA, Kentaro TAMAKI, Takonori ISHIDA, Noriaki OHUCHI, **Hironobu SASANO** : Activation of androgenic pathways results in lower tumor cell proliferation in triple negative breast cancer : 第71回日本癌学会学術総会 2012年 札幌市
8. Ryoko SAITO, Yasuhiro MIKI, Shinya IIDA, Shuko HATA, Kiyoshi TAKAGI, Katsuhiko ONO, Noriaki OHUCHI, Takashi SUZUKI, **Hironobu SASANO** : Induction of aromatase through Aryl hydrocarbon receptor in ER-positive breast cancer : 第71回日本癌学会学術総会 2012年 札幌市
 9. Keely McNAMARA, Takashi SUZUKI, Yasuhiro MIKI, **Hironobu SASANO** : The roles of AR in triple negative breast cancer : 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer 2012 Kanazawa
 10. Kevin C. KNOWER, Sarah Q. TO, Hoi Tin PUN, Kiyoshi TAKAGI, Yasuhiro MIKI, **Hironobu SASANO**, Evan R. SIMPSON, Wah Chin BOON, Colin D. CLYNE : Endocrine disruptors and local estrogen production in the breast tumour microenvironment : 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer 2012 Kanazawa
 11. Minako SAKURAI, Yasuhiro MIKI, Yukiko SHIBAHARA, Hisashi HIRAKAWA, Noriaki Ouchi, Takashi SUZUKI, **Hironobu SASANO** : LIN28B as a Potential Prognostic Marker of Breast Cancer Patients : 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer 2012 Kanazawa
 12. Keely McNAMARA, Tomomi YODA, Yasuhiro MIKI, Niramol CHANPLAKORN, Sansanee WONGWAISAYAWAN, Pimpin INCHAROEN, Youwanush KONGDAN, Yasuhiro NAKAMURA, Takashi SUZUKI, Noriko NEMOTO, Minoru MIYASHITA, Kentaro TAMAKI, Takonori ISHIDA, Noriaki OHUCHI, **Hironobu SASANO** : Androgen receptor in invasive ductal carcinoma and ductal carcinoma in situ (DCIS) component in triple negative breast cancer (TNBC) patients : 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer 2012 Kanazawa
 13. Tomomi YODA, Keely McNAMARA, Yasuhiro MIKI, Kiyoshi TAKAGI, Takashi SUZUKI, Noriaki Ohuchi, **Hironobu SASANO** : Androgenic Regulation of 17bHSD5 Expression in Breast Cancer : 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer 2012 Kanazawa
 14. 高木まゆ、石田孝宣、甘利正和、玉城研太郎、雷 哲明、平川 久、三木康宏、**笹野公伸**、大内憲明 : 浸潤性乳管癌と浸潤性小葉癌のエストロゲン合成代謝における病理学的検討比較 : 第10回日本乳癌学会東北地方会 2013年 仙台市
 15. 依田智美、McNamara Keely、三木康宏、高木清司、鈴木 貴、大内憲明、**笹野公**

伸：乳癌におけるステロイドホルモン代謝酵素17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5の発現調節：第86回日本内分泌学会学術総会 2013年 仙台市

16. 柴原裕紀子、櫻田千華子、三木康宏、笹野公伸：乳癌の転移リンパ節におけるアンドロゲンレセプターの発現解析：第86回日本内分泌学会学術総会 2013年 仙台市

17. マクナマラ キーリー、依田智美、三木康宏、チャンプラコン ニラモン、ヨングァイサヤワン サンサネエ、インチロエンピンピン、コンダン ヨウワヌシュ、王リン、高木清司、高木まゆ、中村保宏、鈴木 貴、宮下 穰、根元紀子、玉城研太郎、石田孝宣、大内憲明、笹野公伸：Androgen metabolism in triple negative

breast cancer (TNBC) patients -multivariate comparison of the findings：第86回日本内分泌学会学術総会 2013年 仙台市

18. 櫻井美奈子、三木康宏、柴原裕紀子、平川 久、鈴木 貴、大内憲明、笹野公伸：LIN28Bの乳癌における臨床病理学的意義：第86回日本内分泌学会学術総会 2013年 仙台市

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書

乳癌の術前化学療法の効果予測モデルの前向き試験とモデル化手法の汎用化の検討

研究分担者 内藤泰宏 慶應義塾大学環境情報学部 准教授

研究分担者 杉本 昌弘 京都大学大学院医学研究科 講師

研究協力者 高田 正泰 京都大学医学部附属病院 乳腺外科 特定助教

本研究は、乳癌の病態や治療効果を予測する数理モデルを作り、複雑な意思決定の過程の可視化や、医療経済負担低減につながる診療アルゴリズムを構築することである。特に原発性乳癌の診療で重要な術前化学療法の病理学的完全奏効とリンパ節転移に関して予測モデルと Web システムを開発してきた。本年

A. 研究目的

日本において、乳癌の発生は約4万人/年、死亡は約1万人/年と、女性における罹患率が最多の癌である。現在の原発性乳癌の治療は、手術療法・薬物療法・放射線療法による集学的治療が主体である。これらの治療方針の選択にはホルモン受容体や HER2/new 発現などの治療効果予測因子を用いた個別化医療が進められているが、抗がん剤の治療効果を単一で予測する因子はまだ確立されていない。

原発性乳がんの、腋窩リンパ節(LN)の転移の有無は、予後予測に重要な因子であり、術前・術後の全身療法の選択や腋窩リンパ節郭清(ALND)の決定に重要な因子である。センチネルリンパ節(SLN)生検は、腋窩リンパ節郭清に比べて低侵襲ではあるが、侵襲性がないわ

度は、前向きに症例データを集め、開発したモデルの評価試験を実施した。また、開発した手法を他の疾患や治療効果予測に一般化するために、モデル開発時に最適化が必要なパラメータの設計方針を調べる試験を実施した。

けではなく、特に高齢者や既往症を有する症例ではリスクを増大させる。このため、より侵襲性の低い画像所見などから SLN 生検の省略可能な症例の選別を行う技術開発も求められている。

同様に、術前化学療法の病理学的完全奏効(Pathological complete response: pCR)も、予後予測因子であり、術後の治療方針決定に重要な因子である。また、術前化学療法を開始する前に、抗がん剤への反応性を予測することで、不要な治療を回避することができ、個別化治療を実現することができる。

このような患者の特定の状態や治療の効果予測を、高精度に行うために、多数のノモグラムが開発されてきている。術前化学療法における3cm以下へのダウンスタージングの可

否と局所手術適応性の可否の予測、センチネルリンパ節転移陽性症例における、非センチネルリンパ節転移の予測などがある。このプログラムは多重ロジスティック回帰(MLR)により、複数の因子から、対象となる事象の確率を計算するが、(1)お互いに独立な少数の因子しかモデルに組み込めない、(2)データに欠損値がある場合に予測値に及ぼす影響が大きい、(3)データ中の予測因子の割合に強く依存するため、他のデータでも高精度に予測する汎用性の確保が難しい、などの問題がある。

これらの問題に対処するため、我々は機械学習の予測アルゴリズムを導入して、複数因子から、高精度な予測を可能とする数理モデルの開発を行ってきた。特に原発性乳癌の診療の意思決定において重要な、1)治療前のリンパ節転移の有無、2)術前化学療法のpCRの予測のモデルを開発し、別施設にて独立して収集したデータで評価試験を実施してきた。また、これらを簡便に使えるよう、Webブラウザでデータの入力、予測、収集、予測結果の評価を行えるシステムの開発も行ってきた。

本年度は、術前化学療法のpCR予測モデルに関して、前向きに評価データを収集し、評価試験を行った。また、これまでに開発してきた数理モデルと従来から使われている多重ロジスティック回帰(Multiple logistic regression; MLR)と比べて予測精度だけでなく、データ欠損に対する耐性の比較や、今後別の診療に重要な因子を予測する場合にどのような方針でモデルのパラメータを最適化すればよいか、方法論を汎用化するための検証・評価を行った。

B. 研究方法

B.1. 術前化学療法の反応性の前向き評価試験

【対象症例】

国内3施設から150例のデータを収集し、学習用データとした。本データ内で一部の症例を外してモデルを学習させ、外した症例で精度検証を行うクロスバリデーションを利用して、モデルのパラメータの最適化を行った。本モデルを、術前化学療法に関する臨床試験(OOTR-N003試験)から評価用に173例のデータをランダムに収集し、評価試験を実施した

対象は、アンストラサイクリン系抗癌剤およびタキサン系抗癌剤の逐次併用レジメンを術前化学療法として施行された症例とした。対象症例は、いずれも同様のプロトコルで治療が行われている。予測アウトカムは、術前化学療法終了時における腋窩リンパ節転移を伴わない乳房内の浸潤癌の消失(y_pT0/isN0)とした。

【モデルの精度】

学習用データで受信者動作特性(ROC)曲線以下の面積AUC (Area under ROC)=0.766 [95%信頼区間 (CI): 0.671-0.861, $P < 0.0001$], 評価用データで 0.787(95% CI: 0.716-0.858, $P < 0.0001$)と高い予測精度と汎化能力を示した。

【前向き評価試験】

新規に3施設から上記対象条件に該当する症例を収集した。この新規データのpCRを学習済みのモデルを用いて予測し、その精度の検証を行った。精度は、Luminalタイプ、HER2

過剰発現タイプ、トリプルネガティブ(TN)タイプの3つのサブタイプ別に検証した。

B. 2. モデル化の汎用化のためのパラメータ最適化の方針検討

【検討方針の概要】

本研究では、モデル中の多因子から pCR を予測するアルゴリズムとして ADTree を用いてきた。さらに、本研究で開発した予測モデルには、予測精度を向上させるために、ADTree を複数作成し最終的な予測は、個々の ADTree の予測結果を平均化して算出する ensemble の手法を用いている。ADTree のパラメータとしては、ツリーのサイズ（ノード数）に該当する boosting 数と、ensemble のパラメータとしては、ADTree の数に該当する bootstrap 数があり、モデルの学習のためには、これらのパラメータを最適化する必要がある。

これらのモデルは、学習データを基にパラメータを最適化するが、新たなデータを与えた場合にも高精度で予測するために、学習データの一部を用いてモデルを作り、使わなかった別の一部のデータを用いてモデルを評価するクロスバリデーションを用いてパラメータの最適化を行ってきた。他の学習方法に比べて最適化しなければならないパラメータが少ない利点があるが、今後本研究で開発した方法で別の因子を予測する場合、どのような方針でパラメータを決定すればよいかを検討しておけば、本技術を汎用化することができる。

そこで、本モデルの重要パラメータである boosting 数と bootstrap 数の値を変えた場合の予測精度を AUC 値とともに調査する。また、ノモグラムで一般に用いられている MLR

との精度比較も行う。また、このような比較では一般に予測精度のみ比較されることが多いが、臨床情報の解析に重要な欠損値に対する耐性を調べるため、

元々のデータセットの欠損値部分に取りうる値を乱数で選択して埋めた仮想的なデータセットを作り、どの程度 AUC 値に揺らぎがでるかを確認する。この仮想的なデータセットはそれぞれのデータごとに 200 パターンを生成し、得られた結果を統計的に比較した。

なお、本研究は京都大学大学院医学研究科・医学部及び医学部附属病院 医の倫理委員会の承認を受けている[承認番号：E-652「原発性乳癌の腋窩リンパ節転移予測モデルおよび術前化学療法による治療効果予測モデルの評価に関する研究」(UMIN 登録番号：UMIN000002107)、E-821「原発性乳癌の腋窩リンパ節転移予測モデルの前向き評価に関する研究」、E-1442「原発性乳癌の術前化学療法による治療効果予測モデルの前向き評価に関する研究」]。

C. 研究結果

C. 1. 術前化学療法の反応性の前向き評価試験結果

昨年度収集し、モデルの評価に使ったデータ（データ1）と、新たに前向きに収集した評価データ（データ2）を表1に示す。

表1 評価データの症例数

データ*	施設	症例数
1	九州がんセンター	45
	愛知県がんセンター	26
	新潟県立がんセンター	102

	計	173
2	京都大学	47
	新潟県立がんセンター	56
	筑波大学	10
	計	113

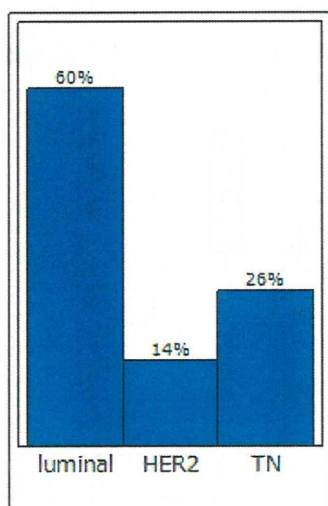
*)データ 1 は、昨年度までに収集済の評価データ。データ 2 は、本年度、新たに前向きに収集した評価データ。

表 2 評価データの pCR 率

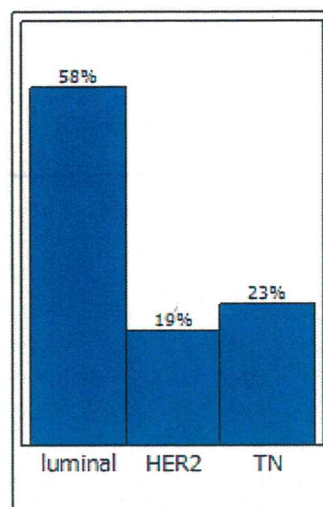
データ*	症例数	pCR 率
1	173	22.5
2	113	33.6
1+2	286	26.9

各データにおける、pCR 率の違いを示す。データ 1 とデータ 2 の合計値も示す。前向きに収集したデータ 2 では、pCR 率が高く、33.6%であった。

A) データセット 1



B) データセット 2



C) データセット 1+データセット 2

図 1 各データセットのサブタイプ分布

各データセットにおけるサブタイプの分布を図 1 に示す。サブタイプ、Luminal タイプ、HER2 高発現タイプ、トリプルネガティブ (TN) の 3 つの分類に分けた。

また、それぞれのデータに関して、予測した結果を受信者動作特性(ROC)曲線とその面積(AUC)で示す。

A) データセット 1

